

**Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil
Isolasi dari *Trichoderma viride* dengan Metode Fermentasi
Semi Padat**

SKRIPSI

**Oleh :
JANATUN NA'IMAH
105090200111043**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil
Isolasi dari *Trichoderma viride* dengan Metode Fermentasi
Semi Padat**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam bidang Kimia

Oleh :
JANATUN NA'IMAH
105090200111043



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil
Isolasi dari *Trichoderma viride* dengan Metode Fermentasi
Semi Padat**

oleh :

JANATUN NA'IMAH
105090200111043

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, M.S
NIP. 195205041980022001

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 195807111992032002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo, MS.
NIP. 195712271986031003

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Janatun Na'imah
NIM : 105090200111043
Jurusan : Kimia
Penulis skripsi berjudul :
Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil Isolasi dari
Trichoderma viride dengan Metode Fermentasi Semi Padat

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Agustus 2014

Yang menyatakan,

(Janatun Na'imah)
NIM. 105090200111043

Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* dengan Menggunakan Metode Fermentasi Semi Padat

ABSTRAK

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler hasil isolasi dari jamur *Trichoderma viride* yang mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase. Pada penelitian ini digunakan serbuk kulit pisang sebagai induser untuk produksi enzim. Aktivitas xilanase ditentukan berdasarkan banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan (xilosa) oleh 1 mL enzim per menit. Pengaruh ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase dilakukan dengan beberapa konsentrasi, yaitu 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 mM. Analisa data menggunakan analisis ragam Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak kasar xilanase dengan penambahan ion Zn^{2+} 40 mM diperoleh sebesar $1,821 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan ion Zn^{2+} berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase ($P < 0,01$). Penambahan ion Zn^{2+} berfungsi sebagai aktivator untuk meningkatkan aktivitas xilanase. Nilai konstanta kinetika tanpa penambahan ion Zn^{2+} diperoleh V_m sebesar $5,32 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan K_M sebesar 8,05 %, sedangkan pada penambahan Zn^{2+} diperoleh V_m sebesar $6,80 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$ dan K_M sebesar 2,87 %

Kata kunci: xilanase, Trichoderma viride, ion Zn^{2+}

The Effect of Zn^{2+} on Xylanase Activity Isolated from of *Trichoderma viride* Using Semi Solid Fermentation

ABSTRACT

Xylanase is an extracellular enzyme produced by *Trichoderma viride* that can hydrolyze xylan became xilosa. The aim of this research was to determine the effect of additional ion Zn^{2+} towards xylanase activity. In this research, the powder of banana's peel was used as an inducer for producing enzyme. The activity of xylanase is determined by reducing sugar that produced by the number of 1 mL enzyme per minutes. The effect of Zn^{2+} on xylanase activity used with several concentrations are 25, 30, 35, 40, 45, and 50 mM. The analysis using completely randomized design (RAL). The result of this research showed that the activity of rough extract xylanase with additional Zn^{2+} 40 mM is $1.821 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$ and Zn^{2+} have significant effect towards xylanase activity ($P < 0,01$). The function of additional Zn^{2+} as an acticvator to increase xylanase activity. The kinetic constant value without additional Zn^{2+} got V_m value is $5.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$ and K_M value is 8.05 %, while additional Zn^{2+} V_m value is $6.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{minute}^{-1}$ and K_M value is 2.87 %.

Key words: xylanase, Trichoderma viride, ion Zn^{2+}

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* dengan Metode Fermentasi Semi padat”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, di Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Maka dari itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS, selaku dosen pembimbing I yang telah member bimbingan dengan penuh kesabaran, member dorongan motivasi dan kesediaan waktunya yang selalu membimbing penulis
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc, selaku dosen pembimbing II yang telah member bimbingan dengan penuh kesabaran, memberi dorongan motivasi dan kesediaan waktunya yang selalu membimbing penulis
3. Dr. Diah Mardiana, MS, selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberi dorongan motivasi
4. Dr. Edi PriyoUtomo, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberi dukungan dalam proses penyelesaian skripsi
5. Bapak Maryono, selaku laboran Biokimia yang memberi kemudahan dalam penelitian ini
6. Bapak Syafi'in dan Ibu Ratiani yang selalu mendoakan dan bekerja keras untuk keberhasilan anak-anaknya
7. Kakak-kakakku Maman Darmawan dan Rachmat Suryaman, adikku Reza Diah P. Tyas serta keluarga yang selalu mendukung dan member semangat, motivasi dan doa
8. Teman-temanku Alvi Salamah, Putri Rakasiwi, Angga Suryantoro, Imaroh Mufidah, Adyatama Ardian, Dani M.

Hizto yang membantu dan memberi semangat dalam menyelesaikan penelitian ini

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun untuk kesempurnaan skripsi ini.

Malang, Agustus 2014

Penulis



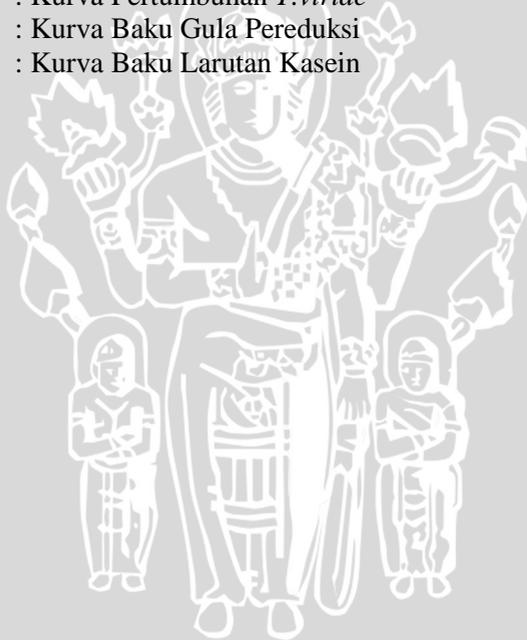
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan	2
1.5 Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim	4
2.2 Aktivitas Enzim	5
2.3 Fermentasi	6
2.4 <i>Trichoderma viride</i>	7
2.5 Xilan	8
2.6 Xilanase	10
2.7 Aktivator dan Inhibitor	11
2.8 Ion Zn^{2+}	11
2.9 Isolasi Enzim	12
2.10 Pengukuran Aktivitas Enzim	13
2.11 Kinetika Enzim	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	16
3.2.1 Bahan Penelitian	16
3.2.2 Bahan Kimia	16
3.2.3 Alat Penelitian	16
3.3 Tahapan Penelitian	16
3.4 Prosedur Kerja	17

3.4.1 Pembuatan Substrat dari Kulit Pisang	17
3.4.2 Pembuatan Media Padat	17
3.4.3 Peremajaan Biakan Murni <i>Trichoderma viride</i>	18
3.4.4 Pembuatan Media Cair	18
3.4.5 Pembuatan Aquades Steril	18
3.4.6 Pembuatan Inokulum	18
3.4.7 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase	19
3.4.8 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi	19
3.4.9 Pembuatan Kurva Gula Pereduksi	19
3.4.10 Pembuatan Kurva Larutan Baku Kasein	20
3.4.11 Uji Kadar Protein	20
3.4.12 Penentuan Aktivitas Xilanase	21
3.4.13 Penentuan Aktivitas Xilanase terhadap Pengaruh Penambahan Ion Zn^{2+}	22
3.4.14 Penentuan Parameter Kinetika enzim Xilanase	22
3.4.14.1 Uji Aktivitas Xilanase Tanpa Penambahan Ion Zn^{2+}	22
3.4.14.2 uji Aktivitas Xilanase dengan Penambahan Ion Zn^{2+}	23
3.5 Analisa Data	23
BAB IV PEMBAHASAN	24
4.1 Isolasi Xilanase dari <i>Trichoderma viride</i>	24
4.2 Pengaruh Penambahan Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase	26
4.3 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis	28
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: <i>Trichoderma viride</i>	8
Gambar 2.2	: Struktur Xilan	10
Gambar 2.3	: Reaksi DNS dengan Glukosa	13
Gambar 2.4	: Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Kecepatan Reaksi Enzimatis	14
Gambar 2.5	: Plot Lineweaver-Burk	15
Gambar 4.1	: Mekanisme Reaksi Enzimatis antara Xilanase dengan Xilan	26
Gambar 4.2	: Kurva Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Variasi Konsentrasi Ion Zn^{2+} (mM)	27
Gambar 4.3	: Kurva Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_o$	29
Gambar C.1	: Kurva Pertumbuhan <i>T. viride</i>	38
Gambar E.1	: Kurva Baku Gula Pereduksi	40
Gambar G.1	: Kurva Baku Larutan Kasein	41



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Klasifikasi Enzim	5
Tabel C.1	: Data Pertumbuhan <i>T.viride</i>	38
Tabel D.1	: Data Absorbansi Gula Pereduksi pada λ 480-550 nm	39
Tabel E.1	: Data absorbansi gula pereduksi pada λ 490 nm	39
Tabel F.1	: Data Absorbansi Kasein pada λ 460-640 nm	40
Tabel G.1	: Data Absorbansi Kasein pada λ 540 nm	41
Tabel I.1	: Nilai Absorbansi Uji Aktivitas Xilanase dan Kadar Protein	43
Tabel J.1	: Absorbansi Ekstrak Kasar Xilanase fraksi dengan Penambahan Variasi Konsentrasi Ion Zn^{2+}	43
Tabel J.2	: Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase dengan Penambahan Variasi Konsentrasi Ion Zn^{2+}	44
Tabel K.1	: Absorbansi Ekstrak Kasar Xilanase tanpa Konsentrasi Ion Zn^{2+}	44
Tabel K.2	: Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase tanpa Konsentrasi Ion Zn^{2+}	45
Tabel K.3	: Absorbansi Ekstrak Kasar Xilanase pada Konsentrasi Ion Zn^{2+} 40 mM	45
Tabel K.4	: Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase pada Konsentrasi Ion Zn^{2+}	46
Tabel M.1	: Aktivitas Xilanase dengan Penambahan Ion Zn^{2+}	47
Tabel M.2	: Analisis Ragam Satu Arah Pengaruh ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase	48
Tabel M.3	: Data uji BNT Pengaruh Ion Zn^{2+} terhadap Aktivitas Xilanase	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.1 Preparasi Larutan	34
A.1 Aquades Steril	34
A.2 Buffer Asetat pH 5	34
A.3 Larutan Asam Asetat 0,2 M	34
A.4 Larutan Natrium Asetat 0,2 M	34
A.5 Reagen DNS	34
A.6 Substrat Xilan 1%	35
A.7 Larutan ZnCl ₂ 25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mM	35
A.8 Larutan NaOH 0,1 M	35
A.9 Larutan NaOH 10%	35
A.10 Pereaksi Biuret	35
Lampiran B Perhitungan Preparasi Larutan	36
B.1 Larutan Asam Asetat 0,2 M	36
B.2 Larutan Natrium Asetat 0,2 M	36
B.3 Larutan NaOH 0,1 M	36
B.4 Larutan Buffer Asetat 0,2 M pH 5	37
B.5 Larutan ZnCl ₂ 25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mM	37
Lampiran C Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>T. viride</i>	38
Lampiran D Penentuan λ Maksimum Gula Pereduksi	39
Lampiran E Pembuatan Kurva Baku Larutan Gula Pereduksi	39
Lampiran F Penentuan λ Maksimum Kasein	40
Lampiran G Pembuatan Kurva Baku Kasein	41
Lampiran H Perhitungan Aktivitas dan Kadar Protein Xilanase	42
H.1 Aktivitas Xilanase	42
H.2 Kadar Protein	42
Lampiran I Pengukuran Aktivitas Xilanase dan Kadar Protein	43
Lampiran J Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase pada Variasi Konsentrasi Ion Zn ²⁺	43
Lampiran K Pengukuran Konstanta Kinetika V _m dan K _m	44
Lampiran L Perhitungan Harga V _m dan K _m	46
Lampiran M Analisa Statistika	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim adalah molekul yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel [1].

Xilanase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa (xilan) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Xilanase dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti jamur, bakteri, dan ragi. Salah satu jamur yang dapat menghasilkan xilanase adalah *Trichoderma viride*. Pada umumnya jamur menghasilkan xilanase dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri, tetapi jamur mempunyai waktu tumbuh yang lebih lama dibandingkan bakteri [2]. Berdasarkan pembentukannya, xilanase merupakan enzim induktif yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat dimana substrat tersebut berfungsi sebagai induser, yaitu xilan [3].

Enzim adalah produk dengan nilai ekonomi yang tinggi karena sangat dibutuhkan untuk menunjang berbagai macam proses industri. Enzim xilanase memiliki beberapa manfaat, seperti digunakan sebagai pakan ternak dan *biobleaching* pada industri kertas. Xilanase banyak dikembangkan dalam industri kertas karena nilai ekonominya yang tinggi dan ramah lingkungan. Xilanase digunakan sebagai pengganti klorin untuk melarutkan lignin, sehingga dapat diperoleh kertas dengan kualitas kecerahan yang tinggi [4]. Enzim xilanase merupakan enzim yang dapat menguraikan xilan menjadi xilosa, sehingga xilanase dapat digunakan pada campuran pakan ternak untuk meningkatkan daya cerna bahan kering karbohidrat yang terdapat dalam pakan tersebut.

Enzim berperan sebagai katalisator yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia, yaitu dengan menurunkan energi aktivasi dari suatu reaksi kimia [5]. Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti temperatur, derajat keasaman (pH), aktivator atau inhibitor, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat [6].

Penambahan ion Zn^{2+} dapat berfungsi sebagai suatu aktivator atau inhibitor. Ion Zn^{2+} dikatakan sebagai aktivator apabila meningkatkan aktivitas terhadap suatu enzim dan sebagai inhibitor apabila menurunkan aktivitas enzim. Berdasarkan penelitian sebelumnya, penambahan ion Zn^{2+} dengan konsentrasi 25, 50, dan 70 ppm dapat meningkatkan aktivitas fosfatase alkali yang akan meningkatkan pertumbuhan ternak ruminansia[7]. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* dengan variasi konsentrasi 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 mM.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh ion Zn^{2+} terhadap aktivitas enzim xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride* ?
2. Berapa nilai parameter kinetika (V_m dan K_M) reaksi enzimatik xilanase yang diproduksi dari *Trichoderma viride*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dibahas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Ion Zn^{2+} berasal dari garamnya yaitu $ZnCl_2$.
2. Variasi konsentrasi ion Zn^{2+} yaitu 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 mM.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh penambahan ion Zn^{2+} terhadap aktivitas enzim xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride*
2. Mengetahui nilai konstanta kinetika, meliputi V_m dan K_M ion Zn^{2+} pada enzim xilanase hasil isolasi dari *Trichoderma viride*

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase yang dapat dimanfaatkan sebagai tambahan pakan ternak.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memiliki peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel [8].

Enzim merupakan katalisator organik yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan karena semua reaksi metabolisme dikatalisis oleh enzim. Jika enzim tidak ada atau aktivitas enzim terganggu, maka reaksi metabolisme sel akan terhambat sehingga pertumbuhan sel juga akan terganggu. Reaksi-reaksi enzimatik dibutuhkan oleh jamur untuk memperoleh makanan atau nutrisi dalam keadaan terlarut yang dapat diserap ke dalam sel, memperoleh energi kimia yang digunakan untuk biosintesis, perkembangbiakan, pergerakan, dan lain-lain [9].

Berdasarkan lokasinya enzim dapat dibedakan menjadi 2 yaitu enzim ekstraseluler (di luar sel) dan enzim intraseluler (di dalam sel). Enzim hanya bekerja mempercepat tanpa mengubah keseimbangan suatu reaksi kimia. Reaksi enzimatik merupakan reaksi antara enzim dengan substrat menghasilkan kompleks enzim-substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang bersifat sementara dan akan terurai kembali apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada tempat atau bagian tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang akan berinteraksi dengan substrat disebut dengan bagian aktif (active site). Persamaan reaksi enzim-substrat ditunjukkan seperti pada persamaan (2.1) [10].



dimana :

- E = enzim
- S = substrat
- ES = kompleks enzim substrat
- P = produk

Pembentukan senyawa kompleks ES dari E dan S berlangsung dengan konstanta kecepatan k_1 . Kompleks ES akan mengalami dua kemungkinan penguraian, yaitu kembali terurai menjadi E dan S dengan konstanta kecepatan k_1 atau melanjutkan reaksi kembali dengan menghasilkan produk P dan E dengan konstanta kecepatan k_2 . Dengan asumsi tidak ada P yang dapat diubah lagi menjadi S [10].

Secara internasional penggolongan enzim dilakukan secara sistematis oleh Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. Enzim digolongkan ke dalam enam kelas utama, masing-masing dengan sub kelas berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis (Tabel 2.1) [6].

Tabel 2.1: Klasifikasi Enzim

No	Kelas	Reaksi yang dikatalisis
1	Oksidoreduktase	Reaksi pemindahan elektron
2	Transferase	Reaksi pemindahan gugus fungsional
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4	Liase	Reaksi pemutusan ikatan C-C, C-O, C-N, membentuk ikatan rangkap
5	Isomerase	Reaksi pemindahan gugus dalam molekul menghasilkan bentuk isomer
6	Ligase	Raksi pembentukan ikatan

2.2 Aktivitas Enzim

Enzim sebagai katalisator dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik yang bila tanpa enzim akan berlangsung lebih lambat, yaitu dengan menurunkan energi aktivasi dari suatu reaksi kimia [5]. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas kerja enzim, yaitu [6]:

1. Temperatur

Enzim bekerja paling aktif pada temperatur yang optimal yang sesuai dengan temperatur lingkungan tempat enzim bekerja. Karena reaksi kimia dipengaruhi oleh temperatur,

maka reaksi yang dikatalisis oleh enzim juga peka terhadap temperatur. Sebelum temperatur optimum, kenaikan temperatur akan diikuti dengan kenaikan aktivitas enzim, sedangkan pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur optimum aktivitas enzim akan turun dengan cepat. Pada temperatur yang tinggi, enzim juga akan terdenaturasi dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim.

2. Derajat Keasaman (pH)

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (zwitter ion). Sehingga perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH rendah atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Sedangkan pH optimum merupakan pH yang menyebabkan aktivitas maksimal.

3. Aktivator dan inhibitor

Enzim membutuhkan aktivator untuk meningkatkan aktivitasnya. Aktivator dapat berupa bahan-bahan anorganik berupa ion-ion dan juga dapat berupa bahan-bahan organik yang disebut koenzim. Sedangkan inhibitor adalah senyawa yang dapat menurunkan aktivitas enzim.

4. Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi bergantung pada konsentrasi enzim yang berperan sebagai pengaktif dalam reaksi. Pada reaksi enzimatik, kecepatan reaksi berbanding lurus dengan konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim, maka reaksi akan berlangsung makin cepat.

5. Konsentrasi Substrat

Peningkatan konsentrasi substrat menyebabkan kecepatan reaksi meningkat, namun pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan meningkatkan kecepatan reaksi sedemikian kecil. Batas ini disebut kecepatan reaksi maksimum (V_m), karena enzim menjadi jenuh oleh substrat.

2.3 Fermentasi

Fermentasi adalah proses terjadinya perubahan kimia suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh

mikroba. Secara umum fermentasi dibagi menjadi 2 model utama yaitu fermentasi media cair dan fermentasi media padat. Xilanase dapat dihasilkan dengan fermentasi cair atau padat [11].

Sistem fermentasi dibedakan menjadi beberapa cara, antara lain [12]:

- a. Fermentasi Sistem Batch
- b. Fermentasi Sistem Kontinyu
- c. Fermentasi Sistem Fed-Batch

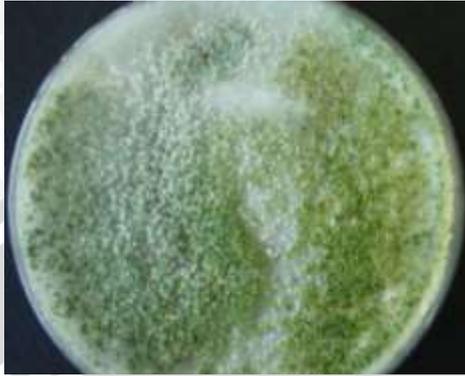
Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan dalam proses fermentasi adalah media fermentasi yang baik. Medium selain mengandung karbon juga harus mengandung nitrogen dan mineral. Medium untuk produksi xilanase selain mengandung karbon dan nitrogen, biasanya mengandung beberapa mineral (seperti KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , dan NH_4^+) serta ion (seperti Fe^{2+} , Co^{2+} , dan Zn^{2+}) [13].

2.4 *Trichoderma viride*

Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi, yang biasanya dihasilkan oleh jamur dan bakteri seperti *Trichoderma viride*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Rhizomucor*. Enzim yang dihasilkan oleh golongan bakteri memiliki ketahanan pada temperatur yang lebih tinggi dibandingkan jamur tetapi aktivitas xilanase dari golongan jamur jauh lebih tinggi dari bakteri. Selain itu, tingkat produksi yang tinggi dan kemudahan dalam kultivikasi membuat jamur lebih banyak digunakan dalam produksi enzim skala industri [14].

Taksonomi *Trichoderma viride* adalah sebagai berikut [14]:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Sordariomycetes
Subclassis	: Hyphomycetidae
Ordo	: Hypocreales
Family	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Species	: <i>Trichoderma viride</i>



Gambar 2.1: *Trichoderma viride*

Trichoderma viride merupakan salah satu jamur yang memproduksi spora dengan cara mitosis (aseksual), memiliki temperatur pertumbuhan optimum 15-30 °C. Jamur dapat mencapai diameter lebih dari 5 cm dalam waktu 9 hari, semula berwarna putih halus kemudian menjadi putih kehijauan dan selanjutnya hijau redup. Jamur ini hidup pada bahan-bahan organik yang telah mati atau tumbuh langsung pada kayu yang komposisi dasarnya adalah selulosa yang merupakan polimer dari glukosa. Jamur ini memiliki enzim selulase untuk mendegradasi selulosa dan lignoselulosa [14].

Penggunaan *Trichoderma viride* memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan jenis jamur lainnya, yaitu dapat ditemukan di berbagai tempat, dapat tumbuh cepat di berbagai substrat, mampu berkembang biak pada kondisi pH asam (2,1-2,5) [8]. *Trichoderma viride* tumbuh di daerah yang memiliki temperatur antara 25-30 °C, dan temperatur tumbuh maksimum antara 50-60 °C [15].

2.5 Xilan

Pada proses fermentasi, penggunaan substrat berpengaruh terhadap produktivitas dan aktivitas enzim. Substrat tertentu didalam medium produksi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresi metabolit selnya [15].

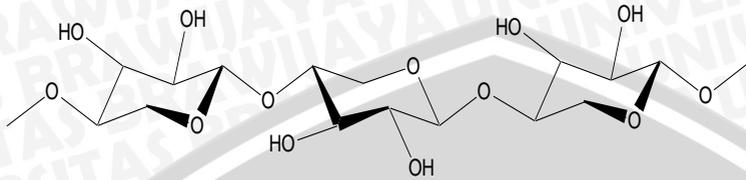
Zat makanan utama bagi pertumbuhan mikroorganisme adalah sumber karbon, nitrogen, dan komponen mineral terutama fosfat. Beberapa sumber karbon yang sering digunakan adalah molases, pati, glukosa, sukrosa, dan laktosa. Produksi enzim xilanase

sebagai sumber karbon adalah xilan. Xilan dengan aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh mikroorganisme akan terhidrolisis menjadi xilosa [15]. Xilan akan dihidrolisis menjadi xilosa dengan bantuan enzim xilanase sehingga dapat dituliskan pada persamaan (2.2) [16]:



Xilosa termasuk dalam kelompok gula pentosa. Hemiselulosa juga dapat didegradasi oleh bakteri selulolitik. Degradasi hemiselulosa juga dapat dilakukan oleh bakteri non selulolitik dengan kapasitas yang minimal. Sebagian besar bakteri ini mampu memfermentasikan xilan [17]. Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa. Polimer xilosa adalah komponen yang paling banyak terdapat dalam hemiselulosa tanaman. Hemiselulosa xilan merupakan xilosa yang berikatan β -1,4 dengan jumlah monomer 150 - 200 unit [16]. Rantai utama xilan terdiri dari unit D-xilopiranosida yang dihubungkan oleh ikatan β -(1,4)D-glikosidik. Struktur xilan semacam ini dapat ditemukan pada kayu keras, kayu lunak, dan rumput-rumputan [18]. Namun ada juga xilan yang rantai utamanya dihubungkan oleh ikatan β -(1,3)D-glikosidik, yaitu pada tanaman alga laut. Struktur xilan tersebut memiliki bentuk fibrillar yang lebih kristalin dan tidak terikat dengan molekul selulosa [19].

Struktur kompleks xilan membutuhkan beberapa enzim yang bekerjasama dalam menghidrolisis xilan secara total. Enzim-enzim pendeградasi xilan disebut enzim xilanolitik atau enzim xilanase. Macam-macam enzim xilanase antara lain: enzim ekso dan endo- β -xilanase (EC.3.2.1.8), enzim β -xilosidase (EC.3.2.1.37), enzim α -L-arabinofuranosidase (EC.3.2.1.55). Enzim endo- β -xilanase mampu memutus ikatan β -1,4 pada bagian rantai utama xilan melalui bagian dalam rantai xilosa menghasilkan xilooligosakarida. Enzim exo-xilanase memotong rantai xilosa dari luar rantai panjang menghasilkan produk utama xilosa dan xilooligosakarida rantai pendek. Enzim β -xilosidase memotong xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Enzim α -L-arabinofuranosidase memotong ikatan α -1,3 arabinofuranosidik pada rantai samping polimer xilan [4].



Gambar 2.2: Struktur Xilan

2.6 Xilanase

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Xilan adalah substrat untuk enzim xilanase yang merupakan penyusun utama hemiselulosa selain glukana dan manan [20]. Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fermentasi. Aplikasi xilanase untuk industri di antaranya untuk industri pangan, pakan, dan pemutih bubuk kertas (pulp). Penggantian penggunaan klor dengan enzim xilanase untuk pemutihan pulp telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi dan sekarang telah digunakan pada beberapa pabrik kertas [8].

Xilanase dapat dihasilkan oleh jamur, bakteri, khamir, alga laut protozoa, siput, crustacea, insekta, dan biji-bijian. Jamur penghasil xilanase diantaranya adalah *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, dan *Penicillium*. Bakteri penghasil xilanase antara lain *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Eschericia coli*, dan *Aeromonas sp.* Beberapa Actinomycetes penghasil xilanase adalah *Streptomyces* dan *Nocardiosis dasonvillei* [4].

Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis yaitu: β -xilosidase, eksoxilase, dan endoxilanase [1]. β -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim β -xilosidase. Endoxilanase mampu memutus ikatan β -1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut [1].

2.7 Aktivator dan Inhibitor

Pengaruh aktivasi dari kation biasanya spesifik. Aktivator merupakan senyawa atau zat yang bersifat meningkatkan aktivitas enzim untuk mengkatalisis reaksi tersebut. Terdapat 15 kation yang ditemukan dapat mengaktifasi satu atau lebih enzim, antara lain: Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , dan NH_4^+ [21].

Inhibitor merupakan senyawa yang dapat menghambat atau menurunkan kecepatan reaksi enzimatik. Dalam praktek aplikasi reaksi enzimatik, inhibitor sering tidak diinginkan dan harus dijaga supaya tidak terdapat inhibitor yang masuk [21]. Penghambatan kerja enzim dapat bekerja secara reversible atau irreversible. Penghambatan secara irreversible adalah pembentukan atau pemecahan ikatan kovalen dalam enzim, sedangkan secara reversible suatu senyawa dapat terikat dan kemudian dapat lepas kembali. Inhibitor reversible terbagi menjadi tiga yaitu inhibitor kompetitif, non-kompetitif dan un-kompetitif [22].

2.8 Ion Zn^{2+}

Seng merupakan zat mineral esensial yang sangat penting bagi tubuh. Terdapat sekitar dua miliar orang di negara-negara berkembang yang kekurangan asupan seng. Defisiensi ini juga dapat menyebabkan berbagai penyakit. Pada anak-anak dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan, mudah terkena infeksi, diare, dan kematian. Konsumsi seng yang berlebih dapat menyebabkan ataksia dan lemah lesu [23].

Seng klorida mempunyai karakteristik sebagai berikut [24]:

- Berbentuk butiran atau bubuk kristal berwarna putih,
- Berat molekul sebesar 136,286 g/mol, berat jenis sebesar 2,91 g/mL, dan titik leleh sebesar 290 °C,
- Tidak beracun tetapi iritan pada kulit,
- Banyak digunakan pada katalis dan obat-obatan,
- Mudah larut dalam air dan pelarut-pelarut organik seperti alkohol, aseton dan sifat ini menunjukkan adanya karakter kovalen dalam ikatannya.

Nilai hasil kali kelarutan dari ion $\text{Zn}(\text{OH})_2$ sebesar $4,5 \times 10^{-17}$. Semakin kecil nilai K_{sp} maka semakin sedikit kelarutan senyawa

tersebut. Pengaruh pH dengan kelarutan adalah semakin rendah nilai pH maka akan semakin mudahlarut. Ion seng(II) dalam suatu katalisator enzim dapat berfungsi sebagai aktivator. Salah satu contoh, menurut [7], ion Zn^{2+} dengan konsentrasi 1 mM mempunyai kecenderungan meningkatkan aktivitas xilanase *Bacillus pumilus*. Sedangkan pada konsentrasi 5 mM, ion Zn^{2+} mampu menurunkan aktivitas xilanase. Berdasarkan penelitian yang sudah ada, ion Zn^{2+} mempunyai sifat untuk meningkatkan aktivitas enzim [8].

2.9 Isolasi Enzim

Isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah jika dibandingkan dengan enzim intraseluler, karena pada enzim ekstraseluler tidak perlu dilakukan pemecahan sel. Pemecahan sel pada isolasi enzim dapat dilakukan dengan mekanik, fisik, kimiawi dan enzimatik melalui penghancuran membran atau dinding sel. Setelah proses penghancuran sel maka dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan enzim dari sisa sel yang telah hancur sehingga mendapatkan ekstrak kasar enzim [25].

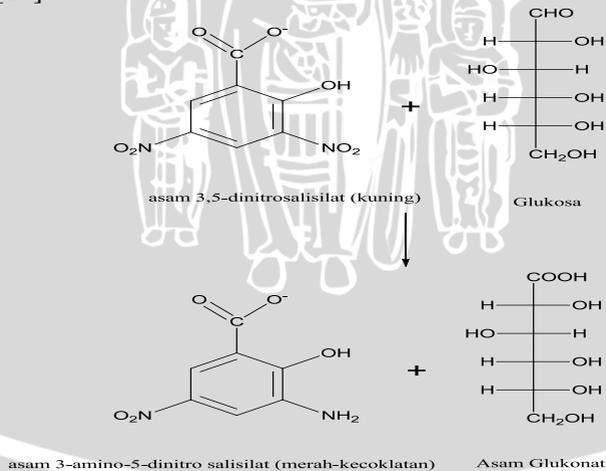
Enzim dapat diisolasi dari hewan, tanaman, ataupun mikroorganisme dengan menggunakan beberapa metode, seperti ekstraksi, sentrifugasi, filtrasi, dan kromatografi. Isolasi enzim dilakukan pada temperatur rendah dan campuran ditambah larutan penyangga atau buffer untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim akan berada pada lapisan air (supernatan) [11]. Operasi utama dalam proses isolasi enzim adalah pemisahan partikel dari larutan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan dan gaya berat tertentu, sehingga menyebabkan sel-sel mikroorganisme mengendap dan dihasilkan supernatan [26].

Isolasi xilanase dilakukan saat mencapai awal fase stasioner (setelah jam ke-60) [9]. Penelitian ini menunjukkan bahwa awal fase stasioner adalah waktu optimum untuk produksi xilanase dari *Trichoderma viride*. Sebelum mengisolasi ekstrak kasar enzim, tahap awal yang dilakukan adalah pembuatan inokulum. Inokulum merupakan kultur mikroba yang diinokulasikan kedalam medium pada saat kultur mikroba pada fase pertumbuhan. Setelah itu, dilakukan produksi enzim sampai jam ke-60 [27].

2.10 Pengukuran Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit, satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1 μg gula pereduksi yang dihasilkan sejumlah enzim permenit [28]. Pengukuran gula pereduksi ditentukan secara spektrofotometri dengan menggunakan reagen DNS (Asam Dinitrosalisilat). Xilanase akan menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Xilosa hasil hidrolisis enzim akan mereduksi asam dinitrosalisilat dan membentuk kompleks warna merah kecoklatan sebagai kompleks warna dari asam-3-amino-5-nitrosalisilat dalam suasana basa sedangkan glukosa akan teroksidasi menjadi asam glukonat. Pada pengukuran gula pereduksi, digunakan standar glukosa karena jumlah mol yang sama dari xilosa atau glukosa apabila bereaksi dengan asam 3,5-dinitrosalisilat dapat menghasilkan 3-amino-5-dinitrosalisilat dengan jumlah mol yang sama, sehingga dapat digunakan standar glukosa untuk mengukur gula pereduksi. Lalu, diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum yaitu 540 nm. Reaksi yang terjadi antara reagen DNS dengan glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.3 [29].

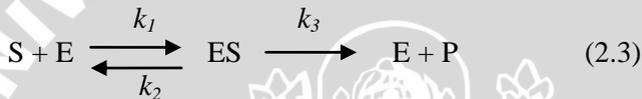
Penggunaan DNS ini lebih banyak digunakan karena lebih cepat, mudah, dan memiliki sensitivitas yang tinggi. Metode tersebut mengukur aktivitas xilanase berdasarkan gula pereduksi yang dihasilkan saat proses hidrolisis antara xilanase dengan substrat xilan dan DNS [13].



Gambar 2.3: Reaksi DNS dan Glukosa

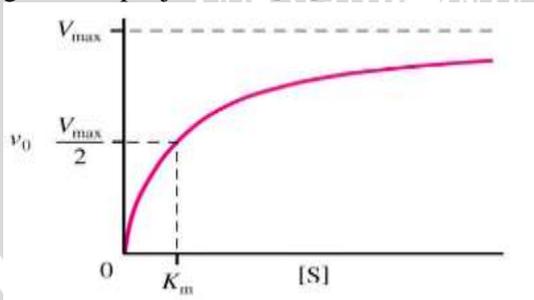
2.11 Kinetika Enzim

Kinetika reaksi enzimatik meliputi dua parameter, yaitu tetapan Michaelis-Menten (K_M) dan kecepatan maksimum (V_m). K_M merupakan konstanta Michaelis-Menten yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum [30]. Menurut Michaelis-Menten, kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi kompleks enzim-substrat [ES], karena apabila tergantung pada konsentrasi substrat [S] maka penambahan konsentrasi substrat dapat menyebabkan bertambahnya kecepatan reaksi, dimana jika digambarkan akan menghasilkan garis lurus. Secara umum reaksi substrat dengan enzim dituliskan pada persamaan (2.3) [31]:



dimana, k_1 merupakan tetapan kecepatan reaksi pembentukan kompleks ES, k_2 merupakan tetapan kecepatan reaksi pembentukan kembali E dan S, dan k_3 merupakan tetapan kecepatan reaksi penguraian kompleks ES menjadi enzim dan hasil reaksi.

V_m adalah batas teoritis dari laju reaksi yang akan tercapai bila kadar substrat demikian tinggi, sehingga tempat aktif selalu ditempati oleh substrat. Jadi, V_m dapat didefinisikan sebagai kecepatan reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat. Grafik hubungan konsentrasi substrat terhadap kecepatan reaksi enzim ditunjukkan pada Gambar 2.4. Pada batas laju maksimum (V_m), enzim menjadi lebih jenuh oleh substrat sehingga pada saat penambahan konsentrasi substrat kembali tidak memberikan pengaruh lagi terhadap laju reaksi [30].



Gambar 2.4: Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat terhadap Kecepatan Reaksi Enzim

Hubungan antara penambahan konsentrasi substrat dengan laju reaksi dapat dinyatakan secara sistematis oleh persamaan Michaelis-Menten (Persamaan 2.4) [32].

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4)$$

dengan :

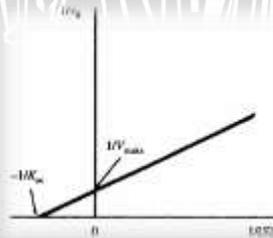
- V_0 = kecepatan awal pada konsentrasi substrat [S]
- V_{maks} = kecepatan maksimum
- K_M = tetapan Michaelis-Menten

Gambar 2.4 merupakan grafik hubungan antara V dan $[S]$, dan dari persamaan (2.4) dapat diketahui bahwa apabila harga $V=1/2 \times V_{maks}$, maka $K_M=[S]$. Hal ini menunjukkan bahwa K_M sama dengan konsentrasi substrat yang menghasilkan kecepatan reaksi sebesar setengah dari kecepatan maksimum [31].

Pengukuran yang didasarkan pada persamaan Michaelis-Menten masih sangat sederhana. Nilai K_M dapat diperoleh dengan menggunakan prosedur grafik sederhana, tetapi sulit untuk menentukan nilai V_m dengan tepat dari grafik Michaelis-Menten karena hanya berupa dugaan dan tidak pernah diketahui nilai sebenarnya. Metode yang lebih baik untuk menentukan nilai-nilai K_M dan V_{maks} dapat menggunakan persamaan Lineweaver-Burk (Persamaan 2.5) yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten. Persamaan Lineweaver-Burk ini merupakan persamaan linier dalam $1/V_0$ dan $1/[S]$ [33].

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2.5)$$

Persamaan Lineweaver-Burk ini merupakan persamaan linier dalam $1/V_0$ dan $1/[S]$.



Gambar 2.5: Plot Lineweaver-Burk

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari-April 2014.

3.2 Bahan Dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah kultur murni *Trichoderma viride* sebagai sumber enzim yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan mempunyai derajat kemurnian pro analisis dan *for microbiology*. Bahan-bahan pro analisis antara lain, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , HCl , ZnCl_2 , NaCl , KCl , NH_4Cl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , DNS, CH_3COOH 100% (Bj: 1,05 g/mL), dan CH_3COONa . Bahan-bahan *for microbiology* antara lain, pepton, *bacto* agar, urea, sedangkan bahan lainnya adalah aquades.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, inkubator (*Heraeus Type B 5042*), magnetic stirrer, penangas air (*Memmert W 200*), neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), neraca analitik (*Bosch PE 620*), jarum ose, pH meter (*Inolab WTW*), spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu Model 160A double beam*), kuvet, oven (*Memmert*), shaker (*Edmund Buhler SM 25 24B*), autoklav (*All American Model 20X*), sentrifuse dingin (*Juan MR 1889*), laminal flow, refrigerator, pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), ayakan 40 mesh, aluminium foil, kapas steril, dan bunsen.

3.3 Tahapan Penelitian

Beberapa tahapan penelitian ini, antara lain:

1. Pembuatan serbuk kulit pisang

2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair dan aquades steril
5. Pembuatan inokulum
6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase dari biakan *Trichoderma viride*
7. Pembuatan kurva baku gula pereduksi
8. Pembuatan kurva baku larutan kasein
9. Uji kadar protein xilanase
10. Uji aktivitas enzim xilanase
11. Uji aktivitas xilanase dengan penambahan ion Zn^{2+}
12. Penentuan konstanta kinetika enzim (K_M dan V_m)
13. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pembuatan Serbuk Kulit Pisang

Kulit pisang dipotong kecil-kecil, dicuci dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 100 °C. Setelah kering, kulit pisang dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh sehingga diperoleh serbuk halus kulit pisang yang digunakan sebagai inducer.

3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan untuk peremajaan jamur *Trichoderma viridae* adalah *Potatoes Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan media padat PDA adalah 20 gram kentang dikupas, dicuci, dan diiris kecil-kecil. Kemudian, ditambahkan aquades hingga 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam. Selama dipanaskan terdapat air yang menguap, maka ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 mL. Lalu, disaring menggunakan kertas saring dan sari kentang yang diperoleh ditambahkan 2 gram dextrosa, 1 mL buffer asetat pH 5, dan 1,5 gram tepung agar. Setelah itu, dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Kemudian, larutan PDA tersebut dipipet sebanyak 4 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas, dilapisi kertas coklat dan diikat dengan karet. Larutan PDA disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. PDA yang telah steril dikeluarkan dari autoklaf

dan didinginkan pada temperatur ruang dengan posisi miring.

3.4.3 Peremajaan Biakan Murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan di dalam laminar air flow yang dilengkapi dengan beberapa bunsen di dalamnya. Jarum ose, tabung biakan murni *Trichoderma viride*, dan tabung media padat dilewatkan pada nyala api bunsen. Lalu, satu mata ose spora *Trichoderma viride* dipindahkan secara aseptis ke dalam media padat. Tabung ditutup dengan kapas steril, kertas coklat, dan diikat dengan karet. Setelah itu, diinkubasi selama 144 jam (6 hari) pada temperatur 30 °C.

3.4.4 Pembuatan Media Cair

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan media cair seperti 0,25 g pepton; 0,1 g KH_2PO_4 ; 0,15 g CaCl_2 ; 0,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g serbuk kulit pisang; 0,5 mL unsur renik dan 0,1 mL asam oleat ditimbang menggunakan neraca analitik mettler. Semua bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. Lalu, diatur pada pH 5 dengan ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5. Setelah itu, diaduk dan dipanaskan hingga mendidih. Ditutup dengan kapas, kertas coklat dan diikat dengan karet, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C dan tekanan 15 psi selama 15 menit.

3.4.5 Pembuatan Aquades Steril

Sebanyak 250 mL aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditutup dengan kapas, kertas coklat dan diikat dengan karet. Kemudian, disterilkan di dalam autoklaf pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit.

3.4.6 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan di dalam laminar air flow dengan cara spora hasil dari biakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari, disuspensikan ke dalam 1 mL aquades steril dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang sudah berisi 100 mL media cair steril. Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi hingga mencapai pertengahan fase logaritma (jam ke-36) dengan menggunakan shaker.

3.4.7 Produksi dan Isolasi Ekstrak Kasar Xilanase

Dipipet 65 mL media basal dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Ditambahkan 25 g substrat dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan temperatur 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 10 mL larutan inokulum secara aseptis yang dilakukan di dalam laminar air flow. Campuran larutan diinkubasi selama 60 jam pada temperatur kamar dan dikocok menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm. Setelah itu, ditambahkan 30 mL buffer asetat pH 5 dan kemudian disentrifugasi dingin dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim xilanase.

3.4.8 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi

Dipipet 1 mL larutan glukosa 300 µg/mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Campuran larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, lalu dikocok sampai homogen. Diukur absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 480-550 nm. Untuk blanko digunakan aquades dengan perlakuan yang sama seperti sampel.

3.4.9 Pembuatan Kurva Gula Pereduksi

Glukosa anhidrat sebanyak 0,15 g dilarutkan dengan aquades secukupnya dalam gelas kimia 250 mL, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan stok glukosa 1500 µg/mL. Larutan stok glukosa 1500 µg/mL dipipet sebanyak (2; 4; 6; 6,8; dan 8) mL dan dimasukkan ke dalam 5 buah labu ukur 100 mL. Ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen, sehingga diperoleh larutan (300, 600, 900, 1000, dan 1200) µg/mL. Setiap konsentrasi larutan glukosa diambil 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda. Masing-masing larutan glukosa tersebut ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir.

Campuran dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen. Setelah itu, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.4.10 Pembuatan Kurva Larutan Baku Kasein

Satu gram kasein dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam gelas kimia 250 mL. Campuran kasein dan aquades diaduk dengan pengaduk magnet dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 M sampai larut. Kasein yang sudah larut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Lalu, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen, sehingga diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Dari larutan stok tersebut, dipipet masing-masing (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mL dan dimasukkan ke dalam 9 labu ukur 10 mL yang berbeda. Kemudian, ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen, sehingga dapat diperoleh larutan kasein (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm.

Diambil 2 mL larutan kasein dengan masing-masing konsentrasi (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000) ppm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL buffer asetat pH 5. Kemudian, campuran larutan tersebut dikocok dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur 50 °C. Sebelum dilakukan pengukuran absorbansi larutan standar, ditentukan panjang gelombang maksimumnya dahulu pada konsentrasi larutan kasein 5000 ppm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 460-640 nm, sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum kasein sebesar 550 nm. Berdasarkan panjang gelombang maksimum tersebut, maka dapat dilakukan pengukuran absorbansi pada larutan standar dengan panjang gelombang 550 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar dengan berbagai konsentrasi tersebut dapat dibuat persamaan regresi linear sehingga dihasilkan kurva baku kasein.

3.4.11 Uji Kadar Protein

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen Biuret, yaitu 2 mL larutan enzim ekstrak kasar dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu, ditambahkan 8 mL reagen biuret dan 2 mL

larutan kasein 5000 ppm. Larutan dikocok dan diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Selanjutnya, diukur serapan pada panjang gelombang 540 nm dan kadar protein dapat diperoleh dengan memplotkan nilai absorbansi pada persamaan regresi kurva baku kasein. Untuk larutan blanko, dipipet 2 mL aquades dan selanjutnya diperlakukan sama seperti perlakuan sebelumnya.

3.4.12 Penentuan Aktivitas Xilanase

Substrat xilan 1% (b/v) sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan selama 15 menit dalam penangas air dengan temperatur 60 °C. Kemudian, ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5 serta 1 mL air bebas reduktor, lalu diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60 °C. Setelah itu, dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi, lalu dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Larutan didinginkan dengan air mengalir dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Kemudian, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas enzim ditentukan dengan analisis kadar gula pereduksi dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku.

Aktivitas xilanase dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$. Satu unit aktivitas enzim bebas diartikan sebagai 1 μg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari hasil hidrolisis xilan yang dikatalis dengan xilanase. Besarnya satu unit aktivitas enzim tersebut dapat dihitung dengan rumus pada persamaan (3.1):

$$AE = \frac{x \times V}{p \times q} \times \frac{Mr \text{ xilosa}}{Mr \text{ glukosa}} \quad (3.1)$$

dimana:

AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{menit}^{-1}$)
 x = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

V	= volume total sampel percobaan pada tiap tabung (mL)
p	= volume ekstrak kasar xilanase (mL)
q	= waktu reaksi (menit)
Mr xilosa	= 150,13 g/mol
Mr glukosa	= 180 g/mol

3.4.13 Penentuan Aktivitas Xilanase terhadap Pengaruh Penambahan Ion Zn^{2+}

Untuk penentuan aktivitas xilanase dengan penambahan ion Zn^{2+} , disiapkan 6 tabung reaksi terlebih dahulu. Masing-masing tabung reaksi diisi 2 mL substrat xilan 1% (b/v) dan kemudian dipanaskan selama 15 menit pada temperatur 60 °C. Lalu, ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL air bebas reduktor dan 1 mL larutan Zn^{2+} dengan beberapa variasi konsentrasi (25; 30; 35; 40; 45 dan 50) mM. Campuran larutan tersebut diinkubasi selama 55 menit pada temperatur 60 °C. Setelah diinkubasi, masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit serta didinginkan dengan air mengalir hingga mencapai temperatur kamar. Diukur absorbansi larutan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 490 nm, sehingga dapat dihitung konsentrasi enzim dan aktivitas enzimnya.

3.4.14 Penentuan Parameter Kinetika Enzim Xilanase

3.4.14.1 Uji Aktivitas Xilanase tanpa Penambahan Zn^{2+}

Pada penentuan aktivitas xilanase tanpa penambahan Zn^{2+} , langkah pertama yang dilakukan adalah disiapkan 5 tabung reaksi dan dimasukkan 1 mL substrat xilan dengan variasi konsentrasi (0,5; 1,0; 1,5; 2,0, dan 2,5) % (b/v). Semua tabung reaksi dipanaskan selama 15 menit dalam penangas air pada temperatur 60 °C dan kemudian didinginkan. Setelah itu, ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5 dan 1 mL air bebas reduktor ke dalam masing-masing tabung reaksi. Lalu, diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit serta didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Diukur absorbansi larutan secara spektrofotometri

pada panjang gelombang 490 nm, sehingga dapat dihitung konsentrasi enzim dan aktivitas enzimnya.

3.4.14.2 Uji Aktivitas Xilanase dengan Penambahan Zn^{2+}

Pada penentuan aktivitas xilanase dengan penambahan Zn^{2+} dilakukan dengan cara dipipet 1 mL substrat xilan dengan variasi konsentrasi (0,5; 1,0; 1,5; 2,0, dan 2,5) % (b/v) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda. Lalu, dipanaskan dalam penangas air pada temperatur 60 °C selama 15 menit dan didinginkan. Masing-masing substrat xilan ditambahkan 1 mL ekstrak kasar xilanase, 1 mL buffer asetat pH 5, 1 mL ion Zn^{2+} , dan 1 mL air bebas reduktor. Semua tabung diinkubasi pada temperatur 60 °C selama 55 menit. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 mL reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit serta didinginkan hingga mencapai temperatur kamar. Diukur absorbansi larutan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 490 nm, sehingga dapat dihitung konsentrasi enzim dan aktivitas enzimnya.

Penentuan kinetika enzim dapat dilakukan dengan cara dibuat plot grafik hubungan antara $\frac{1}{V}$ dan $\frac{1}{[S]}$ hasil konversi dari V dan [S]. Lalu, nilai K_M dan V_{maks} ditentukan berdasarkan persamaan kurva Lineweaver-Burk, yaitu $\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_M}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]}$. Bila $\frac{1}{V} = y$ dan $\frac{1}{[S]} = x$, maka $y = a + bx$, sehingga $a = \frac{1}{V_{maks}}$ dan $b = \frac{K_M}{V_{maks}}$. Dari persamaan tersebut dapat diketahui harga V_{maks} dan K_M .

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengaruh variasi konsentrasi ion Zn^{2+} terhadap aktivitas ekstrak kasar xilanase yang diisolasi dari *Trichoderma viride* dianalisis dengan uji F menggunakan Analisis Ragam Pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu arah dan perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan, nilai F hitung lebih besar dari nilai F tabel (α db) maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Xilanase dari *Trichoderma viride*

Isolasi enzim xilanase dilakukan untuk memisahkan enzim xilanase dari protein-protein lain. Waktu fermentasi yang digunakan dalam proses isolasi enzim xilanase dari *Trichoderma viride* adalah pada fase akhir logaritma yang merupakan fase awal stasioner jamur. Berdasarkan biosintesisnya, xilanase merupakan salah satu enzim induktif yaitu enzim yang dibentuk karena adanya rangsangan dari suatu substrat atau senyawa tertentu sehingga untuk produksinya diperlukan suatu induser. Enzim xilanase merupakan enzim ekstraseluler sehingga untuk memperoleh enzimnya perlu dilakukan sentrifugasi. Prinsip sentrifugasi didasarkan adanya gaya sentrifugal pada partikel, yaitu partikel yang mempunyai berat molekul lebih besar akan mengendap terlebih dahulu. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi merupakan enzim ekstrak kasar yang terdiri dari protein enzim dan protein non enzim, sedangkan endapan yang terbentuk merupakan sisa komponen-komponen media dan sel *Trichoderma viride*.

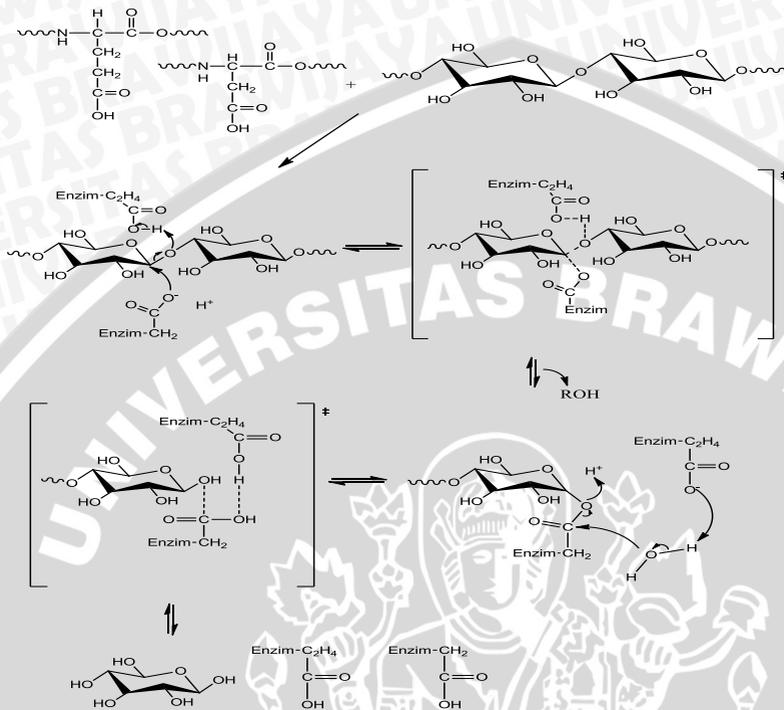
Dalam proses isolasi enzim ditambahkan larutan buffer asetat pH 5 yang berfungsi untuk mempertahankan kestabilan dari enzim xilanase dan pH larutan. Larutan buffer mengandung asam lemah dan basa konjugat lemah atau garamnya, dimana larutan buffer ini mengandung konsentrasi asam yang cukup tinggi yang akan bereaksi dengan ion -OH^- yang ditambahkan dan mengandung konsentrasi basa yang sama tingginya untuk bereaksi dengan ion H^+ sehingga pH larutan tetap tidak berubah. Dengan adanya penambahan larutan dengan pH di bawah titik isoelektrik enzim, dapat meningkatkan kelarutan dari enzim tersebut.

Ekstrak kasar xilanase yang diperoleh berupa supernatan berwarna coklat sebanyak 100 mL dan selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas dan kadar protein. Xilanase akan menghidrolisis xilan menjadi xilosa, dimana xilosa yang dihasilkan akan bereaksi dengan DNS membentuk 3-amino-5-nitrosalisilat yang berwarna kuning kecoklatan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm. Aktivitas xilanase dapat ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku

sehingga dapat diperoleh konsentrasi gula pereduksi dan aktivitasnya dihitung melalui persamaan (3.1). Pengukuran kadar protein enzim xilanase ditentukan dengan menggunakan reagen Biuret yang didasarkan pembentukan kompleks yang berwarna biru antara ion Cu^{2+} dengan gugus $-\text{CO}$ dan $-\text{NH}$ dari rantai peptida dalam suasana basa.

Reaksi enzimatik merupakan reaksi antara enzim dengan substrat yang menghasilkan kompleks enzim-substrat. Dalam pembentukan gula pereduksi, sisi aktif enzim xilanase akan bereaksi dengan substrat xilan (Gambar 4.1). Xilanase memiliki gugus aktif yang dapat menghidrolisis xilan, yaitu gugus karboksil yang merupakan gugus aktif dari asam amino jenis asam aspartat dan asam glutamat. Mekanisme reaksi enzimatik perubahan xilan menjadi xilosa terjadi melalui pembentukan intermediet kompleks enzim-substrat. Gugus karboksilat dari rantai samping asam amino aspartat akan menyerang ikatan glikosidik pada C1 xilan yang mengikat atom O. Pasangan elektron bebas dari atom O untuk membentuk ikatan glikosidik diterima oleh ion H^+ dari asam amino glutamat sehingga terbentuk kompleks enzim-substrat. Kemudian terjadi hidrolisis oleh adanya H_2O pada kompleks enzim-substrat tersebut, sehingga terbentuk monomer gula produksi (xilosa).

Konsentrasi xilosa hasil hidrolisis xilanase dengan xilan diperoleh sebesar $7,368 \mu\text{g/mL}$ dan selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas xilanase. Nilai aktivitas xilanase yang dihasilkan sebesar $1,117 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$. Untuk menentukan kadar protein, hasil pengukuran nilai absorbansi (Lampiran G) diplotkan dengan persamaan regresi pada kurva baku kasein, sehingga diperoleh kadar protein sebesar $1,45 \text{ mg/mL}$.



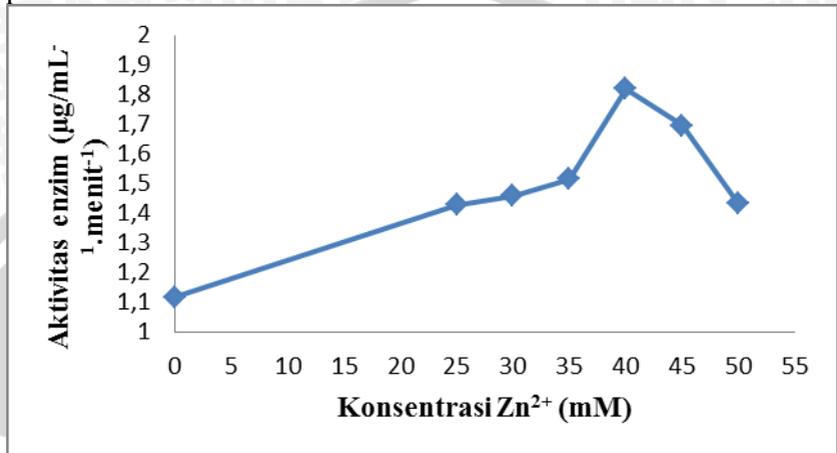
Gambar 4.1: Mekanisme Reaksi Enzimatis antara Xilanase dengan Xilan

4.2 Pengaruh Penambahan Zn²⁺ terhadap Aktivitas Xilanase

Uji penambahan ion Zn²⁺ pada xilanase untuk menunjukkan pengaruh Zn²⁺ terhadap aktivitas enzim xilanase. Terdapat beberapa variasi konsentrasi Zn²⁺ yang digunakan, yaitu 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 mM. Pada Gambar 4.2 terlihat bahwa semua sampel yang mengandung Zn²⁺ dapat meningkatkan aktivitas enzim xilanase. Dalam hal ini menunjukkan bahwa ion Zn²⁺ dengan beberapa variasi konsentrasi, yaitu 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 mM bekerja sebagai aktivator terhadap aktivitas enzim xilanase.

Dari Gambar 4.2 terlihat bahwa aktivitas optimum xilanase dicapai dengan penambahan Zn²⁺ pada konsentrasi 40 mM. Aktivitas xilanase mengalami peningkatan dengan penambahan Zn²⁺ pada konsentrasi 25 mM sampai 35 mM dan mengalami penurunan aktivitas pada konsentrasi 45 mM dan 50 mM. Tetapi penurunan

aktivitas xilanase tersebut tidak melebihi aktivitas xilanase tanpa penambahan ion Zn^{2+} .



Gambar 4.2: Kurva Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase terhadap Variasi Konsentrasi Ion Zn^{2+} (mM)

Aktivitas enzim xilanase dengan penambahan ion Zn^{2+} terus meningkat sampai konsentrasi Zn^{2+} sebesar 40 mM. Peningkatan aktivitas enzim mungkin dikarenakan ion tersebut berikatan dengan sisi aktif enzim yang membentuk kompleks enzim-substrat, sehingga dapat menstabilkan xilanase dan berfungsi sebagai kofaktor enzim xilanase. Adanya pengikatan ion pada sisi aktif enzim tersebut dapat menyebabkan perubahan struktur konformasi enzim sehingga aktivitas katalitiknya meningkat. Seperti halnya yang terjadi pada ion Co dapat meningkatkan aktivitas enzim β -xilosidase menjadi dua kali lebih besar [8]. Ion Zn^{2+} dan Co^{2+} termasuk dalam golongan transisi yang mempunyai orbital d kosong, sehingga ion Zn dan Co akan menarik pasangan elektron bebas atom O dari xilanase. Ion Zn^{2+} yang berperan sebagai aktivator merupakan asam Lewis (akseptor elektron) seperti ion H^+ dari gugus $-COOH$ asam glutamat. Ion ini akan mempermudah penyerangan ion karboksilat dari asam aspartat terhadap atom pada posisi C_1 yang mengikat atom O pada ikatan glikosidik polimer xilan. Sisi aktif enzim dari rantai samping asam glutamat akan mengikat ion Zn^{2+} . Ion Zn^{2+} akan menerima pasangan elektron bebas atom O. Kemudian akan terjadi hidrolisis oleh H_2O yang menyebabkan ikatan glikosidik polimer xilan terputus dan membentuk xilosa yang merupakan monomer xilan. Pengaruh

penambahan ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase juga didukung dengan adanya literatur bahwa ion Zn^{2+} 1 mM dapat meningkatkan aktivitas xilanase *Bacillus pumilus* [7]. Berdasarkan literatur tersebut dapat disimpulkan bahwa ion Zn^{2+} dapat berfungsi sebagai kofaktor yang meningkatkan aktivitas xilanase.

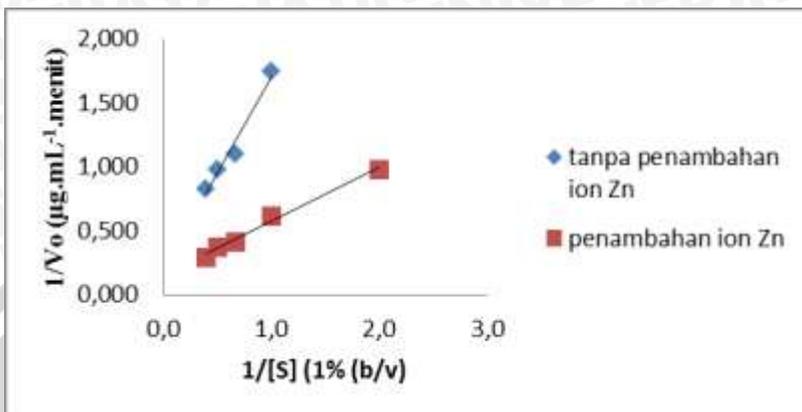
Berdasarkan uji statistik dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) ditunjukkan bahwa penambahan Zn^{2+} berpengaruh terhadap aktivitas xilanase yang ditunjukkan dengan F hitung > F tabel (data lengkap lampiran M). Pada uji BNT 5% ditunjukkan bahwa pada konsentrasi 25 mM hingga 50 mM mempunyai pengaruh yang nyata terhadap aktivitas xilanase yang ditunjukkan dengan BNT hitung > BNT 5%.

4.3 Penentuan Parameter Kinetika Reaksi Enzimatis

Penentuan kinetika reaksi enzimatis ini meliputi dua parameter, yaitu K_M dan V_m . K_M adalah Konstanta Michaelis-Menten yang merupakan konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum dan V_m merupakan kecepatan reaksi ketika enzim jenuh dengan substrat. Pada penelitian ini, nilai K_M dan V_m ditentukan dengan tanpa adanya aktivator dan dengan penambahan aktivator, yaitu ion Zn^{2+} .

Pada Gambar 4.3 terlihat bahwa konsentrasi substrat dapat mempengaruhi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Semakin kecil konsentrasi substrat maka semakin besar pula kecepatan reaksinya. Dan sebaliknya, semakin besar konsentrasi substratnya maka nilai kecepatan reaksi juga semakin besar.

Berdasarkan Gambar 4.3 diperoleh kurva hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_o$ tanpa adanya aktivator dan dengan penambahan aktivator, yaitu ion Zn^{2+} pada konsentarsi 40 mM. Pada penentuan kinetika reaksi enzimatis tanpa penambahan ion Zn^{2+} diperoleh persamaan $y = 1,513x + 0,188$, sehingga dapat diperoleh nilai K_M sebesar 8,05 % dan V_m sebesar $5,32 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$. Penentuan kinetika reaksi enzimatis dengan penambahan ion Zn^{2+} 40 mM diperoleh persamaan $y = 0,421x + 0,147$ dengan nilai K_M sebesar 2,87 % dan V_m sebesar $6,80 \mu\text{g.mL}^{-1}.\text{menit}^{-1}$.



Gambar 4.3: Kuva Hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_o$



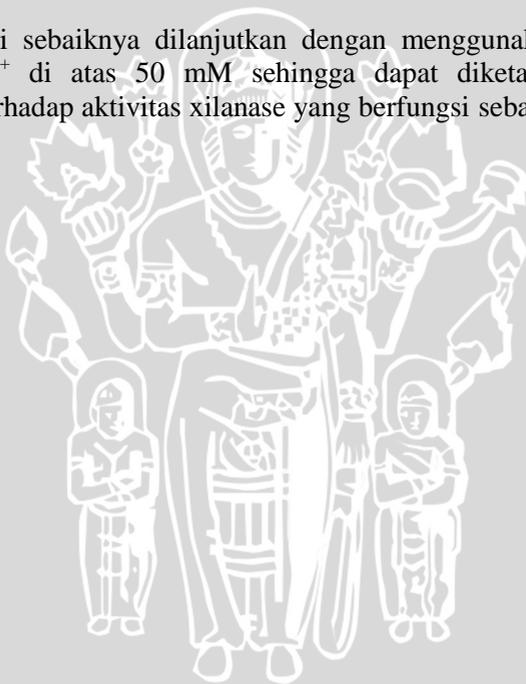
BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan ion Zn^{2+} dengan konsentrasi 25 mM sampai 50 mM berfungsi sebagai aktivator yaitu mampu meningkatkan aktivitas xilanase. Kinetika reaksi enzimatik tanpa penambahan ion Zn^{2+} , diperoleh nilai K_M dan V_m sebesar 8,05 % dan $5,32 \mu g \cdot mL^{-1} \cdot menit^{-1}$. Pada penambahan ion Zn^{2+} 40 mM diperoleh nilai K_M sebesar 2,87 % dan nilai V_m sebesar $6,80 \mu g \cdot mL^{-1} \cdot menit^{-1}$.

5.2 Saran

Penelitian ini sebaiknya dilanjutkan dengan menggunakan konsentrasi ion Zn^{2+} di atas 50 mM sehingga dapat diketahui pengaruh ion Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase yang berfungsi sebagai pakan ternak.



DAFTAR PUSTAKA

- [1]Richana, N, dan Lestina, P., 2002, **Produksi Xilanase untuk Biokonversi Limbah Biji Kedelai**, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor
- [2]Nurlaili, N., 2009, **Uji Biologis Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) yang Diolah dengan Ekstrak Metanol dan Fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* serta *Trichoderma viride* pada Ayam Broiler**, Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan IPB, Bogor
- [3]Widjaja, S., T. Purwadaria dan P.P. Ketaren, 2008, **Apparent Induction of Xilanase by *Bacillus pumilus* PU4-2 Using Pretreated Substrates**, *Microbiol Indones*, Vol 2: 44-48
- [4]Srinivasan, M.C. dan M.V. Rele, 1995, **Microbial Xilanase for Paper Industry**, *Ind. J. Microbiol*, 35: 93-101
- [5]Smith, J. C., 2009, **Biotechnology 5th Edition**, Cambridge University Press, New York
- [6]Lehninger, A.L., 1997, **Dasar-Dasar Biokimia, Jilid I**, Alih Bahasa: Thenawidjaja, M., Erlangga, Jakarta
- [7]Ardiningsih, P., 2002, **Produksi dan Karakterisasi Xilanase Isolat dari Rayap**, Universitas Indonesia, Depok
- [8]Richana, N., T. Irawadi, N. Anwar dan K. Syamsu, 2008, **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase Serta Karakterisasi Enzimnya**, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- [9]Irfani, A., 2007, **Enzim**, <http://achmadirfani.files.com/2007/11/enzim.doc>, tanggal akses 1 Februari 2014
- [10]Tucker, G.A, 1995, **Fundamentals of Enzyme Activity**, In Tucker and Wood (*Eds.*), **Enzyme In Food Processing**, Chapman and Hall, India
- [11]Rahman, A., 1992, **Teknologi Fermentasi Industrial Produksi Metabolit Primer**, Arcan, Jakarta

- [12]Rusmana, I., 2008, **Sistem Operasi Fermentasi**, Departemen Biologi FMIPA IPB, Bogor Jawa Barat
- [13]Oktarina, E., 2008, **Penapisan dan Uji Aktivitas Bakteri Alkalo Termofilik Penghasil Xilanase**, Departemen Biologi FMIPA Universitas Indonesia, Depok
- [14]Girindra, 1990, **Biokimia**, Gramedia, Jakarta
- [15]Waksman, S. A., 1961, **Soil Microbiology**, John Wiley and Sons, London
- [16]Vanadianingrum, E., S., 2008, **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Xilanase dari Cairan Rumen Kambing dan Sumber Air Panas di Cipanas**, ITB, Bogor
- [17]Russell J. B. dan G. G. Bruckner. 1991. **Microbial ecology of the normal animal intestinal tract**. In: J.B. Woolcock (Editor). *Microbiology of Animal and Animal Products*. Elsevier. New York
- [18]Stanbury, P.F. dan Whitaker, A., 1984, **Principles of Fermentation Technology**. Pergamon Press, London, P. 26-71
- [19]Tuohy, M.G., Laffey, C. D., dan Coughlan, M. P, 1995, **Characterization of The Individual Components of The Xylanolytic Enzyme System of *Talaromycesemersonii***, Elsevier, *Biores, Technol*, 50 : 37-42
- [20]Subramaniyan, S. dan Prema, P, 2002, **Biotechnology of Microbial Xilanase : Enzymology, Molecular Biology, And Application**, Crit, Rev, in *Biotechnol*, 22 (1) : 33 – 64
- [21]Miller dan Litsky, 1976, **Industrial Microbiology**, Mc Graw Hill Inc, New York, pg. 146-147
- [22]Hetland, D.H., M. Coch dan B. Svihus, 2004, **Role of Insoluble Non-starch Polysaccharides InPoultry Nutrition**, *World Poul, Sci. J*, 60: 415-422.
- [23]Sony, 2009, **Penentuan Kadar Logam Seng (Zn) dan Tembaga (Cu) dalam Air PAM Hasil Penyaringan Yamaha Water Purifier Tipe**

- Drinking Stand**, Departemen Kimia FMIPA Universitas Sumatera Utara, Medan
- [24]Sax, N.I., 1987, **Hawley's Condensed Chemical Dictionary (7thed)**, Van Nostrand Reinhold Co. Inc, New York
- [25]Putra, G.P. Ganda, 2009, **Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (PG) Endogenous dari Pulp Biji Kakao**, Jurnal Biologi XIII (1) : 21-24
- [26]Judoamidjojo, R.M., A.A. Darwis dan E.G. Said, 1992, **Pengantar Teknologi Fermentasi**, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor
- [27]Widyasari, S., 2007, **Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar Xilanase dari *Trichoderma viride***, Skripsi Program Sarjana Kimia, Universitas Brawijaya, Malang
- [28]Chaplin, M., 2008, **Enzymes and Enzyme Technology**, www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html, tanggal akses 1 Februari 2014
- [29]Sadikin, M., 2002, **Biokimia Enzim**, Widya Medika, Jakarta
- [30]Segel, I.H., 1975, **Biochemical Calculation**, 2nded, John Wiley and Sons, New York
- [31]Poedjiadi, A., 1994, **Dasar-dasar Biokimia**, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- [32]Cooper, P.D., 1986, **The Enzim**, Academic Press Inc., New York
- [33]Blacon, 1995, **Purification and Properties of Xilanase A From Alkali-tolerant *Bacillus sp strain BP-23***, American society for microbiology, Barcelona

LAMPIRAN

Lampiran A. Preparasi Larutan

A.1 Aquades Steril

Aquades dipersiapkan sebanyak 250 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Erlenmeyer ditutup dengan kapas lalu disterilkan dengan autoklav pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit.

A.2 Buffer Asetat pH 5

Dipipet sebanyak 14,8 mL larutan asam asetat 0,2 M dan dimasukkan ke dalam beaker glass 250 mL, ditambahkan 34,2 mL larutan natrium asetat 0,2 M dan diaduk hingga homogen. Campuran larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

A.3 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,2 M

Larutan asam asetat glasial 100 % (Bj: 1,05 g/mL; BM: 60 g/mol; konsentrasi 17,5 M) dipipet sebanyak 1,15 mL dengan menggunakan pipet ukur 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi aquades, kemudian diencerkan dengan ditambahkan aquades hingga tanda batas.

A.4 Pembuatan Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Natrium asetat (BM: 82,02 g/mol) sebanyak 1,64 gram dilarutkan dengan aquades secukupnya dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan ditambahkan aquades hingga tanda batas.

A.5 Pembuatan Reagen DNS (Dinitrosalisilat)

Sebanyak 1 gram NaOH; 18,2 gram Na-K Tartarat; 0,2 gram fenol dan 0,5 gram Na₂SO₃ dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam beaker glass 100 mL. Ditambahkan 1 gram asam dinitrosalisilat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan magnetik stirer. Setelah larut, dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas.

A.6 Pembuatan Substrat Xilan 1%

Ditimbang xilan sebanyak 1 gram dan dimasukkan dalam beaker glass 100 mL kemudian dilarutkan dengan buffer asetat pH 5 secukupnya. Dipindahkan larutan dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 hingga tanda batas.

A.7 Pembuatan Larutan $ZnCl_2$ 25; 30; 35; 40; 45; dan 50 mM

Ditimbang seng klorida ($ZnCl_2$) sebanyak 0,6819 gram (BM $ZnCl_2$ 136,38 g/mol), dilarutkan dengan aquades dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL sehingga diperoleh larutan $ZnCl_2$ 50 mM. Larutan $ZnCl_2$ 50 mM dipipet sebanyak 22,5; 20; 17,5; 15; dan 12,5 mL, dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan $ZnCl_2$ 25; 30; 35; 40; 45; dan 50 mM.

A.8 Larutan NaOH 0,1 M

NaOH sebanyak 0,4 gram ditimbang dan dilarutkan dengan aquades 50 mL dalam beaker glass 250 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

A.9 Larutan NaOH 10%

NaOH sebanyak 1,00 gram ditimbang, dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam gelas kimia 100 mL, dan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

A.10 Pereaksi Biuret

Ditimbang 0,15 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dan 0,6 g $NaKC_4O_6H_4$, dilarutkan dengan aquades sebanyak 30 mL dalam gelas kimia 100 mL. Ditambahkan sebanyak 30 mL larutan NaOH 10 % sambil diaduk dengan pengaduk. Larutan campuran dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan ditambahkan aquades sampai tanda batas.

Lampiran B. Perhitungan Preparasi Larutan

B.1 Larutan Asam Asetat 0,2 M

Larutan asam asetat 0,2 M dibuat dari asam asetat glasial 100% (Bj: 1,05 g/mL; BM: 60 g/mol) dengan cara:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi asam asetat glasial} &= \frac{\text{Berat/Jenis}}{\text{BM}} \\ &= \frac{1,05 \times 1000 \text{ g/L}}{60 \text{ g/mol}} \\ &= 17,5 \text{ M}\end{aligned}$$

Untuk membuat konsentrasi 0,2 M dilakukan pengenceran Dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 17,5 &= 100 \times 0,2 \\ V_1 &= 1,143 \text{ mL}\end{aligned}$$

Dipipet larutan asam asetat dengan pipet ukur 5 mL sebanyak 1,15 mL, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi aquades dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

B.2 Larutan Natrium Asetat 0,2 M

Larutan natrium asetat 0,2 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $\text{CH}_3\text{COONa} = 82,02 \text{ g/mol}$):

$$\begin{aligned}\text{mol CH}_3\text{COONa} &= [\text{CH}_3\text{COONa}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat CH}_3\text{COONa} &= \text{mol CH}_3\text{COONa} \times \text{BM CH}_3\text{COONa} \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 80,02 \text{ g/mol} = 1,6 \text{ g}\end{aligned}$$

B.3 Larutan NaOH 0,1 M

Larutan NaOH 0,1 M dibuat sebanyak 100 mL (Mr NaOH = 40 g/mol)

$$\begin{aligned}\text{mol NaOH} &= [\text{NaOH}] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,01 \text{ mol} \\ \text{massa NaOH} &= \text{mol NaOH} \times \text{Mr NaOH} \\ &= 0,01 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} = 0,40 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan NaOH 0,1 M maka NaOH yang harus ditimbang adalah 0,40 g.

B.4 Larutan Buffer Asetat 0,2 M pH 5

Pembuatan larutan buffer dengan pH yang diharapkan dapat dibuat dengan mencampurkan larutan asam asetat dengan larutan natrium asetat berdasarkan persamaan di bawah ini:

$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

Pembuatan larutan buffer asetat pH 5 dapat dilakukan dengan cara 50 mL larutan asam asetat ditambah dengan 90,99 mL larutan Na-asetat dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{pKa Asam asetat} = 4,74$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{(50 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}) / (50+v) \text{ mL}}{V \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} / (50+v) \text{ mL}}$$

$$5 = 4,74 - \log \frac{50}{V}$$

$$V = 90,99 \text{ mL}$$

B.5 Larutan ZnCl₂ 25; 30; 35; 40; 45; dan 50 mM

- Larutan ZnCl₂ 50 mM dibuat sebanyak 100 mL
[ZnCl₂] 50 mM = 50 x 10⁻³ = 0,05 M
Mol ZnCl₂ = 0,05 M x 100 mL = 5 mmol
Massa ZnCl₂ = mol ZnCl₂ x BM ZnCl₂
= 5 mmol x 136,38 mg/mmol
= 681,9 mg
= 0,682 g
- Larutan ZnCl₂ 45 mM dibuat sebanyak 25 mL
M₁ x V₁ = M₂ x V₂
50 mM x V₁ = 45 mM x 25 mL
V₁ = 22,5 mL
- Larutan ZnCl₂ 40 mM dibuat sebanyak 25 mL
M₁ x V₁ = M₂ x V₂
50 mM x V₁ = 40 mM x 25 mL
V₁ = 20 mL
- Larutan ZnCl₂ 35 mM dibuat sebanyak 25 mL
M₁ x V₁ = M₂ x V₂
50 mM x V₁ = 35 mM x 25 mL
V₁ = 17,5 mL
- Larutan ZnCl₂ 30 mM dibuat sebanyak 25 mL
M₁ x V₁ = M₂ x V₂

$$50 \text{ mM} \times V_1 = 30 \text{ mM} \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 15 \text{ mL}$$

- Larutan ZnCl_2 25 mM dibuat sebanyak 25 mL

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

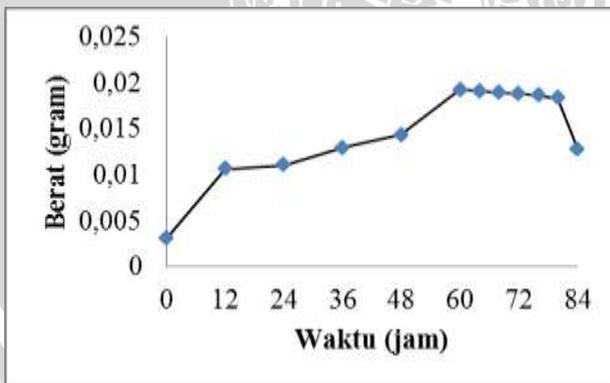
$$50 \text{ mM} \times V_1 = 25 \text{ mM} \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 12,5 \text{ mL}$$

Lampiran C. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *T. viride*

Tabel C.1: Data pertumbuhan *T. viride*

Waktu (jam ke)	Berat Kering Sel (gram)		
	I	II	Rata-rata
0	0,0026	0,0036	0,0031
12	0,0106	0,0108	0,0107
24	0,0109	0,0112	0,0111
36	0,0139	0,0121	0,013
48	0,0157	0,0131	0,0144
60	0,0194	0,0192	0,0193
64	0,0193	0,019	0,0192
68	0,0192	0,0188	0,019
72	0,019	0,0187	0,0189
76	0,0186	0,0187	0,0187
80	0,0183	0,0184	0,0184
84	0,0126	0,013	0,0128



Gambar C.1: Kurva Pertumbuhan *T. viride*

Lampiran D. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Gula Pereduksi

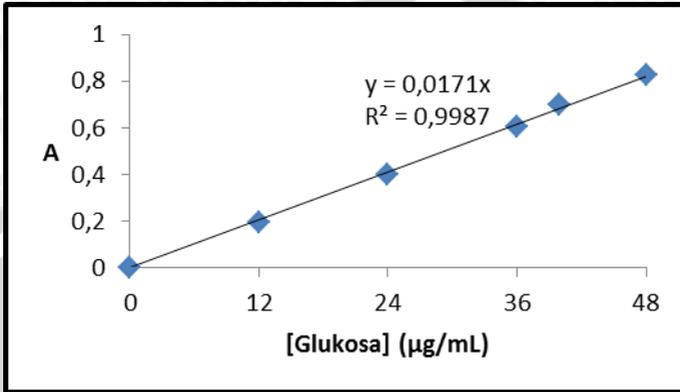
Tabel D.1: Data absorbansi gula pereduksi pada $\lambda = 480-550 \text{ nm}$

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
480	0,163	520	0,144
485	0,197	525	0,136
490	0,204	530	0,129
495	0,194	535	0,122
500	0,187	540	0,116
505	0,174	545	0,107
510	0,160	550	0,102
515	0,154		

Lampiran E. Pembuatan Kurva Baku Larutan Baku Gula Pereduksi

Tabel E.1: Data absorbansi gula pereduksi

Konsentrasi glukosa ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
12	0,230	0,178	0,181	0,196
24	0,425	0,349	0,422	0,398
36	0,642	0,598	0,566	0,602
40	0,695	0,702	0,702	0,699
48	0,807	0,858	0,806	0,824



Gambar E.1: Kurva Baku Gula Pereduksi

Lampiran F. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kasein

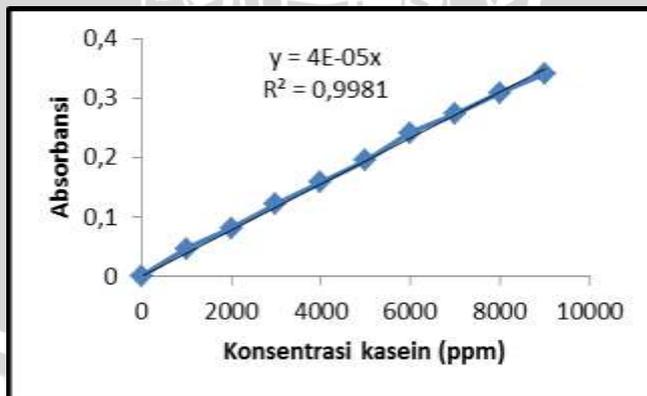
Tabel F.1: Data absorbansi kasein pada $\lambda = 460-640$ nm

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
460	0,086	550	0,203
480	0,116	560	0,200
500	0,153	570	0,188
525	0,194	580	0,178
530	0,198	600	0,149
535	0,201	620	0,112
540	0,205	640	0,075
545	0,204		

Lampiran G. Pembuatan Kurva Baku Kasein

Tabel G.1: Data absorbansi kasein pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

Konsentrasi kasein ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0	0	0	0	0
1000	0,052	0,049	0,048	0,049
2000	0,081	0,085	0,087	0,084
3000	0,141	0,140	0,138	0,139
4000	0,16	0,161	0,162	0,161
5000	0,202	0,206	0,205	0,204
6000	0,226	0,233	0,229	0,229
7000	0,278	0,270	0,281	0,276
8000	0,307	0,319	0,315	0,314
9000	0,331	0,342	0,337	0,337



Gambar G.1: Kurva Baku Larutan Kasein

Lampiran H. Perhitungan Aktivitas dan Kadar Protein Xilanase

H.1 Aktivitas Xilanase

Data absorbansi rata-rata ekstrak kasar pada $\lambda=485$ nm adalah 0,126. Sedangkan persamaan regresi linear pada kurva standar gula pereduksi yaitu $y = 0,0171 \cdot x$, sehingga dapat ditentukan konsentrasi gula pereduksi.

$$\begin{aligned} Y &= 0,0171 x \\ 0,126 &= 0,0171 x \\ X &= \frac{0,126}{0,0171} \\ &= 7,368 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Dengan demikian maka dapat ditentukan aktivitas xilanase:

$$\begin{aligned} AE &= \frac{x \times V \times fp}{p \times q} \times \frac{Mr \text{ xilosa}}{Mr \text{ glukosa}} \\ &= \frac{7,368 \times 10}{1 \times 55} \times \frac{150,13}{180} \\ &= 1,339 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} \times 0,834 \\ &= 1,117 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1} \end{aligned}$$

H.2 Kadar Protein

Data absorbansi rata-rata ekstrak kasar pada $\lambda= 540$ nm adalah 0,258. Sedangkan persamaan regresi linear pada kurva standar gula pereduksi yaitu $y = 0,00004X$, sehingga dapat ditentukan konsentrasi kasein. Konsentrasi total = konsentrasi protein enzim + kasein 5000 ppm

$$\begin{aligned} y &= 0,00004X \\ 0,258 &= 0,00004X \\ x &= 6450 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Maka konsentrasi enzim = konsentrasi protein total - konsentrasi kasein yang ditambahkan

$$= 6450 \text{ ppm} - 5000 \text{ ppm}$$

$$= 1450 \text{ ppm}$$

$$= 1,450 \text{ mg/mL}$$

Lampiran I. Pengukuran Aktivitas Xilanase (λ 490 nm) dan Kadar Protein Xilanase (λ 540 nm)

Tabel I.1: Nilai absorbansi dari uji aktivitas xilanase pada λ 490 nm dan kadar protein

No	Jenis Pengukuran	A1	A2	A3	Arata-rata
1	Aktivitas Xilanase	0.119	0.129	0.129	0.126
2	Kadar Protein	0,253	0,268	0,253	0,258

Lampiran J. Aktivitas Ekstrak Kasar Xilanase pada variasi Konsentrasi Zn^{2+}

Tabel J.1. Absorbansi ekstrak kasar xilanase dengan penambahan variasi konsentrasi Zn^{2+}

Konsentrasi Zn^{2+} (mM)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0	0,119	0,129	0,129	0,126
25	0,24	0,224	0,227	0,230
30	0,238	0,22	0,246	0,235
35	0,231	0,276	0,224	0,244
40	0,335	0,278	0,267	0,293
45	0,3	0,25	0,268	0,273
50	0,24	0,232	0,222	0,231

Tabel J.2. Aktivitas ekstrak kasar xilanase dengan penambahan variasi konsentrasi Zn^{2+}

Konsentrasi Zn^{2+} (mM)	Absorbansi	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas enzim ($\mu\text{g/mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
25	0,230	13,450	1,428
30	0,235	13,743	1,459
35	0,244	14,269	1,515
40	0,293	17,135	1,819
45	0,273	15,965	1,695
50	0,231	13,509	1,434

Lampiran K. Pengukuran Konstanta Kinetika V_m dan K_M

Lampiran K. Pengukuran Konstanta Kinetika V_m dan K_M

Tabel K.1: Absorbansi ekstrak kasar xilanase tanpa konsentrasi Zn^{2+}

Konsentrasi substrat % (b/v)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0,5	0,037	0,04	0,046	0,041
1	0,071	0,122	0,131	0,108
1,5	0,2	0,151	0,163	0,171
2	0,24	0,136	0,201	0,192
2,5	0,22	0,256	0,211	0,229

Tabel K.2: Aktivitas ekstrak kasar xilanase tanpa konsentrasi Zn²⁺

Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas xilanase ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$)	1/[S]	1/V ₀
0,5	2,398	0,218	2	4,584
1	6,316	0,575	1	1,740
1,5	10,000	0,910	0,7	1,099
2	11,228	1,022	0,5	0,979
2,5	13,392	1,218	0,4	0,821

Tabel K.3: Absorbansi ekstrak kasar xilanase pada konsentrasi Zn²⁺ 40 mM

Konsentrasi substrat % (b/v)	Absorbansi			
	A1	A2	A3	A rata-rata
0,5	0,124	0,161	0,218	0,165
1	0,154	0,171	0,464	0,263
1,5	0,351	0,397	0,424	0,39
2	0,424	0,439	0,443	0,434
2,5	0,436	0,606	0,629	0,557

Tabel K.4: Aktivitas ekstrak kasar xilanase pada konsentrasi Zn^{2+} 40 mM

Konsentrasi substrat % (b/v)	Konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas xilanase ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{menit}$)	$1/[S]$	$1/V_0$
0,5	9,649	1,024	2	0,976
1	15,380	1,633	1	0,613
1,5	22,807	2,421	0,7	0,413
2	25,380	2,694	0,5	0,371
2,5	35,573	3,457	0,4	0,289

Lampiran L. Perhitungan Harga V_m dan K_M

Nilai V_m dan K_M ditentukan dari persamaan garis pada kurva hubungan antara $1/[S]$ dengan $1/V_0$.

- ❖ Tanpa menggunakan Zn^{2+}

$$y = 1,513x + 0,188$$

$$\frac{1}{V_m} = 0,188$$

$$V_m = 5,32 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{5,319} = 1,513$$

$$K_M = 8,05 \%$$

- ❖ Menggunakan Zn^{2+} 40 mM

$$y = 0,421x + 0,147$$

$$\frac{1}{V_m} = 0,147$$

$$V_m = 6,80 \mu\text{g. mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$$

$$\frac{K_M}{V_m} = \frac{K_M}{6,802} = 0,421$$

$$K_M = 2,87 \%$$

Lampiran M. Analisa Statistika

Data aktivitas ekstrak kasar enzim xilanase dengan penambahan variasi konsentrasi Zn^{2+} yang dianalisis dengan menggunakan pola rancangan acak lengkap (RAL):

Tabel M.1: Aktivitas xilanase dengan penambahan ion Zn^{2+}

Konsentrasi Zn^{2+} (mM)	Aktivitas Enzim ($\mu\text{g. mL}^{-1}\cdot\text{Menit}^{-1}$)			Jumlah	Rataan
	A1	A2	A3		
0	0,739	0,801	0,801	2,341	0,780
25	1,490	1,390	1,409	4,289	1,430
30	1,477	1,366	1,527	4,370	1,457
35	1,434	1,713	1,390	4,537	1,512
40	2,079	1,726	1,657	5,462	1,821
45	1,862	1,552	1,664	5,078	1,693
50	1,490	1,440	1,378	4,308	1,436

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penambahan Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan analisis dengan menggunakan uji F dengan cara sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2]}{np} = \frac{30.383}{3,7} = 43,964$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. $JK \text{ total} = [\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2] - FK$
 $= 46,153 - 43,964$
 $= 2,189$

- b. $JK \text{ Perlakuan (JKp)} = \frac{[\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2]}{n_i} - FK$
 $= 45,911 - 43,964$
 $= 1,947$

- c. $JK \text{ percobaan (JKg)} = JK \text{ total} - JK \text{ perlakuan}$
 $= 2,189 - 1,947$
 $= 0,241$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT) Setiap Sumber Keragaman

- a. $Kuadrat \text{ tengah perlakuan (KTp)} = \frac{JKp}{dbperlakuan}$

$$= \frac{1,947}{6}$$

$$= 0,325$$

$$\begin{aligned} \text{b. Kuadrat Tengah galat percobaan (KT}_G) &= \frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}} \\ &= \frac{0,247}{14} \\ &= 0,017 \end{aligned}$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G} = \frac{0,325}{0,017} = 18,839$$

$$F_{tabel} = F(0,05; 6; 14) = 3,07$$

Karena $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak yang artinya Zn^{2+} berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas xilanase, maka dilakukan uji BNT dengan $\alpha = 0,05$

➤ Menghitung nilai BNT dengan $\alpha = 5\%$

$$BNT(\alpha) = t_{\frac{\alpha}{2}, db} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}}$$

$$\begin{aligned} BNT(0,05) &= t_{\frac{0,05}{2}, 14} \sqrt{\frac{2 \times 0,017}{3}} \\ &= 0,132 \end{aligned}$$

Kemudian dibuat tabel selisih dua nilai rata-rata dari ketujuh variasi Zn^{2+} yang disusun dari nilai terkecil hingga nilai terbesar.

Tabel M.2: Analisis ragam satu arah pengaruh Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel}	
					5%	1%
Perlakuan	6	1,947	0,325	18,839	3,07	4,45
Galat percobaan	14	0,241	0,017			
Total	20	2,188				

Tabel M.3: Data uji BNT pengaruh Zn^{2+} terhadap aktivitas xilanase

Zn^{2+}	Zn^{2+}	0	25	50	30	35	45	40
	Rataan	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
0	0,780	0	0,64	0,65	0,67	0,73	0,91	1,04
mM		0	9	6	6	2	2	0
25	1,430		0	0,00	0,02	0,08	0,26	0,39
mM				6	7	3	3	1
50	1,436			0	0,02	0,07	0,25	0,38
mM					1	6	7	5
30	1,457				0	0,05	0,23	0,36
mM						6	6	4
35	1,512					0	0,18	0,30
mM							0	8
45	1,693						0	0,12
mM								8
40	1,821							0
mM								
Notasi		A	B	B	B	B	C	C

Keterangan :

- A,B, dan C : berpengaruh sama
- D dan E : berpengaruh beda